

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD / FIOCRUZ
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

GENOTIPAGEM DE *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*
ISOLADOS DE POEIRA DOMICILIAR E AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DA PRESENÇA DO
ANTÍGENO EM MORADORES DE UMA COMUNIDADE
RURAL DO AMAZONAS

GLEICA SOYAN BARBOSA ALVES

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD / FIOCRUZ
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM SAÚDE, SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

GLEICA SOYAN BARBOSA ALVES

GENOTIPAGEM DE *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*
ISOLADOS DE POEIRA DOMICILIAR E AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DA PRESENÇA DO
ANTÍGENO EM MORADORES DE UMA COMUNIDADE
RURAL DO AMAZONAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa Interinstitucional de Pós-
Graduação em Saúde, Sociedade e
Endemias na Amazônia, da Universidade
Federal do Amazonas e Instituto Leônidas
e Maria Deane, como exigência do
Programa para obtenção do grau de
Mestre.

Orientadora: Doutora Ani Beatriz Jackisch Matsuura

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A474g Alves, Gleica Soyan Barbosa
Genotipagem de CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS e C. GATTII isolados de poeira domiciliar e avaliação da susceptibilidade a antifúngicos e da presença do antígeno em moradores de uma comunidade rural do Amazonas / Gleica Soyan Barbosa Alves. 2016

70 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cryptococcus. 2. poeira domiciliar. 3. antifúngicos. 4. diversidade genética. 5. criptococose. I. Matsuura, Ani Beatriz Jackisch II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

GLEICA SOYAN BARBOSA ALVES

GENOTIPAGEM DE *Cryptococcus neoformans* E *C. gattii*
ISOLADOS DE POEIRA DOMICILIAR E AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E DA PRESENÇA DO
ANTÍGENO EM MORADORES DE UMA COMUNIDADE
RURAL DO AMAZONAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas e Instituto Leônidas e Maria Deane, como exigência do Programa para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 11 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz)

Prof. Dr. Bodo Wanke
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz)

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

À papai e à mamãe

Agradecimentos

Ao final da jornada, é gratificante chegar até aqui e poder agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Começo agradecendo a Deus, que me deu forças para superar os desafios e adversidades encontrados ao longo do caminho.

À minha família, que sempre sentiu orgulho de cada conquista alcançada.

Aos meus pais, pessoas fundamentais na minha vitória, que algumas vezes questionavam minhas ausências nos finais de semana, quando precisava ir ao laboratório concluir os experimentos para chegar até aqui, mas que sempre me apoiaram nas decisões que tomei. Pai, Mãe, obrigada por me incentivarem, entenderem as minhas escolhas e me permitirem continuar estudando.

Ao Rodrigo Maia, amigo, companheiro, parceiro de laboratório, revisor, tradutor, técnico de informática, mil e uma utilidades. Me apoiou desde o processo de seleção e, me fez companhia no laboratório durante os finais de semana, quando todos os minutos eram essenciais para obtenção dos resultados. Me ajudou a fazer os experimentos, deu palpite nos protocolos, ajudou a escrever, a imprimir, me distraiu quando necessário e me mostrou que “fazendo tudo com carinho, as coisas acontecem”. Muito obrigada Rô!

À minha orientadora, Doutora Ani Beatriz Jackisch Matsuura, sempre se preocupando com o meu crescimento profissional. Muitos tem uma orientadora, eu tive uma segunda mãe, que sempre me incentivou a ir aos cursos e congressos e me aconselhou quando eu entrava em parafuso porque o projeto não andava. Obrigada por me orientar a sempre fazer o que é certo, por se preocupar como estavam as coisas, me acalmar quando as coisas não saem como esperamos, e por acima de tudo, ser amiga. Muito obrigada profa, a senhora é um exemplo!

À CAPES que me concedeu a bolsa para continuar estudando, qualificando e contribuindo para o avanço da Pesquisa no Brasil.

Ao PPGSSEA, seus discentes, docentes, coordenadores e secretariado. Muito obrigada por me aguentarem esses dois anos perturbando vocês!

À Profa. Dra. Maria Ivone Lopes, pela orientação durante o Estágio em Docência, por todo conhecimento transmitido, pela paciência, e amizade.

À MSc Fernanda Fonseca, pelas conversas agradáveis e pela disponibilidade na elaboração dos mapas.

Ao MSc Antônio Balieiro, pelas conversas agradáveis e pela disponibilidade na análise estatística.

À Doutora Márcia Lazéra, sempre atenciosa pelo esclarecimento de todas as dúvidas em relação a aplicação do kit nos pacientes.

Ao Doutor Felipe Naveca e à toda equipe da Virologia e Plataforma de Sequenciamento, pela disponibilidade e auxílio durante todo o processo de sequenciamento. Em especial ao Victor Souza, que me ajudou e me deu muitas broncas enquanto tentava fazer as reações de sequenciamento, que sempre encontrou um lugar para sequenciar as placas e me ajudou com as análises.

À equipe do Laboratório de Micologia da Fundação de Medicina Tropical, que me recebeu de braços abertos e me permitiu fazer parte daquela grande família. Obrigada por me deixarem fazer “terapia” nos dias de coleta, vou sentir saudades das conversas, risadas e das festas!

Aos colegas, que cantaram, riram e choraram nos erros e acertos, muito obrigada! O apoio de vocês naqueles momentos onde 99% era desespero, e bastava falar 1% sobre o mestrado para os meus olhos encherem de lágrimas e vocês me fizeram rir. Obrigada pelo carinho, amizade, pelos momentos alegres e até pelas broncas quando eu não almoçava direito.

À equipe “Lago do Limão” em especial à Regina Medeiros, que conhece a região como a palma da mão. E às alunas Jusselene Santos e Rosiane Matias, que foram a campo e ajudaram na construção dessa dissertação. Meninas, obrigada por tudo, vocês são parte essencial desse projeto!

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane e seus funcionários que, de alguma forma, mesmo sem entender nada do que eu fazia no laboratório, me ajudaram nesta jornada e sempre torceram para que os experimentos funcionassem e eu pudesse defender. O meu obrigado também é para vocês.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento!

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora
é a hora de compreender mais para temer menos”*

Marie Curie

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica ocasionada pela inalação de propágulos ressecados do fungo *Cryptococcus*. As duas principais espécies causadoras de doença são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Nesse trabalho o objetivo foi avaliar a presença de agentes da criptococose em moradores e moradias de uma comunidade rural do Amazonas e caracterizar os isolados ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* quanto à diversidade genética utilizando a técnica de sequenciamento de multilocus (MLST) e a susceptibilidade a cinco antifúngicos utilizando fitas de E-test. Foram analisadas 103 amostras de poeira domiciliar, destas em 12 casas foi possível realizar isolamento de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* dos tipos moleculares VNI e VGII. Foram encontrados os STs já conhecidos ST46 para *C. gattii* e ST93 para *C. neoformans* e novos alelos, resultando em novos STs para as duas espécies. A avaliação da susceptibilidade a antifúngicos revelou a presença de dois isolados de *C. gattii* resistentes a fluconazol. Todos os moradores tiveram resultado de CrAg negativo, apesar de na poeira das suas moradias serem isolados os agentes de criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, criptococose, diversidade genética, antifúngicos, poeira domiciliar

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by the inhalation of resected propagules of *Cryptococcus* fungus. The two main species that cause disease are *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In this study the objective was to evaluate the presence of cryptococcosis agents in residences of a rural community of Amazonas and characterize the environmental isolates of *C. neoformans* and *C. gattii* for genetic diversity using multilocus sequencing typing (MLST) and antifungal susceptibility using E-test. The total of 103 samples of indoor dust were analyzed, in 12 houses the isolation of *Cryptococcus neoformans* and / or *C. gattii* molecular types VNI and VGII were possible. The STs knowed for *C. gattii* ST46 and ST93 for *C. neoformans* were found. In addition, new alleles were found, resulting in new STs for the two species. The evaluation of the antifungal susceptibility revealed the presence of two strains of *C. gattii* with fluconazole resistance. All residents had negative results CrAg, despite the dust of their homes present cryptococcosis agents.

Keywords: *Cryptococcus*, cryptococcosis, genetic diversity, antifungal drugs, indoor dust.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CAP59	Gene associado à capsula de polissacarídeo
CGB	Canavanina-Glicina Azul de Bromotimol
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CrAg	Antígeno criptocócico
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECV	<i>Epidemiological Cutoff Values</i>
EIA	Imunoensaio Enzimático
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPD1	Gene associado à glicerol-3-fosfato desidrogenase
GmbH	<i>Gesellschaft mit beschränkter Haftung</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IGS1	Gene espaçador da região intergênica
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
KCl	Cloreto de potássio
LA	Aglutinação em látex
LAC	Gene associado à lacase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LFA	Ensaio de fluxo lateral
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-Morfolinopropanossulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
NSA	Ágar semente de Níger

OK	Oklahoma
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>PLB1</i>	Gene associado à fosfolipase B1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-EIA	<i>Polymerase Chain Reaction – Enzyme Immunoassay</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
SAB	Ágar Sabouraud dextrose
<i>SOD1</i>	Gene associado à superóxido desmutase
ST	<i>Sequence Type</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic Dna</i>
rRNA	<i>Ribossomal Ribonucleic Acid</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFC	Unidade formadora de colônia
<i>URA5</i>	Gene associado à pirofosforilase monofosto de orotidina
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>

Sumário

INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Descoberta e nomenclatura	17
2.2 Criptococose.....	19
2.2.1 Diagnóstico	21
2.3 Testes de susceptibilidade a antifúngicos	25
2.4 Ecologia.....	27
2.5 Métodos moleculares.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Delineamento do Estudo	34
4.2 População e Local de Estudo.....	34
4.3 Obtenção dos isolados	34
4.4 Identificação dos isolados.....	35
4.4.1. Identificação molecular das cepas de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> isoladas	36
4.4.2. Tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST)	37
4.5 Teste de susceptibilidade a antifúngicos	38
4.6 Avaliação da presença de antígenos CrAg LFA.....	39
5 RESULTADOS.....	41
6 DISCUSSÃO	49
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	65
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	66
Anexo B – <i>Primers</i> e condições para amplificação utilizados para a realização do MLST	67
Anexo C – Detalhamento dos isolados obtidos	68
Anexo D – Detalhamento do MLST das amostras inconclusivas	70

INTRODUÇÃO

A criptococose humana só se tornou reconhecida como uma grande ameaça à saúde com o início da pandemia da aids nos anos 1980 (MAY *et al*, 2016). Hoje, a meningite criptocócica é a mais importante infecção fúngica oportunista com alta mortalidade em pacientes com HIV, mesmo com uso de terapia antifúngica, tornando-se uma das micoses mais importantes do mundo (ILLNAIT-ZARAGOZI *et al*, 2014; PARK *et al*, 2009). A doença é adquirida pela inalação de propágulos infecciosos dos membros do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* presentes no ambiente (PERFECT, 2006).

Cryptococcus neoformans tem distribuição mundial e pode ser isolado a partir de várias fontes ambientais, incluindo solo, árvores e excretas de pássaros, sendo encontrado principalmente em excretas de pombos. *Cryptococcus gattii* é tradicionalmente citado como ocorrendo em climas tropicais e subtropicais associados a espécies de árvores como eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*), oiti (*Moquilea tomentosa*), cassia rosa (*Cassia grandis*) e ficus (*Ficus microcarpa*) (ELLIS; PFEIFFER, 1990; LAZÉRA *et al*, 1998; 2000; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). Mas, em todo o mundo os nichos ecológicos do complexo *C. neoformans*/*C. gattii* continuam a ser investigados (ILLNAIT-ZARAGOZI *et al*, 2011; ROMEO *et al*, 2012; CHOWDHARY *et al*, 2012; CATTANA *et al*, 2014; MAZZA *et al*, 2013; FERREIRA *et al*, 2014; ANZAI *et al*, 2014; FRASES, *et al*, 2009; MAY *et al*, 2015; COLOM *et al*, 2012).

Nos últimos anos, diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para realizar a diferenciação genética intraespecífica das espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre as principais técnicas destacam-se PCR *fingerprinting* utilizando *primers* específicos ou microssatélites, polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (AFLP, do inglês

Amplified Fragment Length Polymorphism), polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e tipagem por sequenciamento por multilocus (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) onde a combinação dos alelos em cada um dos loci define o perfil alélico ou tipo de sequência (ST) (MEYER *et al*, 2009).

Estudos de isolados no Brasil mostram considerável diversidade genética entre as cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* e, demonstram também, a ocorrência simultânea de diferentes tipos/genótipos (VN1/AFLP1 com VNIV/AFLP2 e VGII/AFLP6) em ocos de árvores (TRILLES *et al*, 2008).

No Amazonas, estudos avaliaram os genótipos em indivíduos de uma unidade de saúde, havendo predomínio do tipo VNI, seguido de VGII (SILVA *et al*, 2012 e FREIRE *et al*, 2012), mesmos tipos moleculares encontrados por Alves *et al*, (2016) em isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* de amostras ambientais na cidade de Manaus.

São escassos os trabalhos sobre isolamento de *Cryptococcus* de poeira domiciliar, mesmo sendo demonstrado o risco de pacientes em adquirir a doença (SWINNE, *et al* 1989) (PASSONI *et al*, 1998; COSTA, 2008). Na região Amazônia, Costa (2008) em Belém (PA), isolou de poeira domiciliar os tipos moleculares VNI e VGII. Brito-Santos *et al*, (2015) avaliando poeira domiciliar no município de Santa Isabel do Rio Negro (AM), foram capazes de encontrar *C. gattii* do tipo molecular VGII, os ST's 7, 5, 20 e os novos perfis 264 a 268.

Uma vez que se conhece o ST faz-se necessário conhecer o perfil de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos. Vários trabalhos têm avaliado o perfil de susceptibilidade antifúngica, demonstrando assim uma preocupação crescente com o comportamento dos microrganismos isolados de amostras clínicas e ambientais (TRILLES *et al*, 2004; HORTA *et al*, 2005, SOUZA *et al*, 2005; PEDROSO *et al*, 2006; TAY *et al*, 2006; KHAN *et al*, 2007; THOMPSON *et al*, 2009; CHONG *et al*, 2010; VARMA *et al*, 2010; CICHON *et al*, 2011;

MATOS *et al*, 2012; SILVA *et al*, 2012, TRPKOVIC *et al*, 2012). No Amazonas, Silva *et al* (2012) e Alves *et al* (2016) realizaram testes de susceptibilidade para isolados clínicos e ambientais, respectivamente, de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Nestes estudos, todos os isolados foram considerados susceptíveis.

Ainda há a necessidade de mais estudos na área de micologia no estado do Amazonas, principalmente em áreas rurais. Devido a isso foi proposto a realização do presente trabalho no município de Iranduba, que surgiu como um dos núcleos populacionais na periferia de Manaus a partir da implantação da Zona Franca e do Distrito Industrial. Iranduba possui várias comunidades rurais, entre elas a Comunidade Lago do Limão, que tem como ocupação principal a agricultura e a pesca.

Em consideração à gravidade da criptococose, o aumento significativo de sua ocorrência, o pouco conhecimento a respeito do perfil molecular e de resistência aos agentes antifúngicos de *Cryptococcus*, e que tais fatores foram raramente objeto de pesquisa em cepas de origem ambiental principalmente da Região Amazônica, percebe-se de grande importância a realização desse estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Descoberta e nomenclatura

O primeiro isolamento de *Cryptococcus* aconteceu entre os anos de 1894 e 1895 por dois pesquisadores em locais distintos. O médico e cientista Francesco Sanfelice (1861-1945), nascido em Roma, Itália, fundador e primeiro diretor do Instituto de Higiene da Universidade de Cagliari, Itália, estudou as leveduras que cresciam em uma grande variedade de sucos de frutas (maçã, cereja, uva, limão, laranja, pêssego, pera, tomate, melão, entre outros). E a partir de um sumo de pêssego que foi fermentado em frasco não-estéril, foi possível isolar pela primeira vez uma levedura que foi denominada *Saccharomyces neoformans* (ISHAM). Este trabalho, marco inicial dos estudos sobre criptococose, foi publicado na Revista do Instituto de Higiene da Universidade do Cagliari (Itália) (LACAZ, 2002).

Nesse mesmo período, Otto Busse, Professor de patologia na Universidade de Greifswald (Alemanha), descreveu um patógeno perigoso removido de uma lesão na tíbia de uma mulher. Por considerar o organismo parecido com o gênero *Saccharomyces*, denominou o patógeno como *Saccharomyces hominis*. Assim, desde o início desta história, a descoberta de Sanfelice indicou que esta levedura não é um patógeno humano obrigatório, podendo ser encontrada em outros lugares (BARNETT, 2010).

Em 1901, o micologista francês Jean Paul Vuillemin (1861-1932), Professor de História Natural na Faculdade de Medicina da Universidade de Nancy, França, transferiu-os do gênero *Saccharomyces* para o gênero *Cryptococcus* (do grego, *krypto* – oculto/secreto, e *kokkos* – grão/formato esférico) por não produzirem ascósporos (BARNETT, 2010; ISHAM).

Mais de 20 anos depois, Rhoda Benham, da Universidade de Columbia, em New York e Jacomina Lodder no Centraalbureau voor Schimmelcultures em Delft apontaram que muitas

leveduras, que receberam nomes diferentes (*Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Torula*, *Debaryomyces*), claramente pertenciam à mesma espécie. Naquela época, Benham batizou a espécie considerando-as como *Cryptococcus neoformans*, enquanto Lodder chamou *Torulopsis neoformans*. Até que em 1950, Benham de forma bem-sucedida recomendou a adoção de '*Cryptococcus neoformans*' como o nome autêntico para os isolados (BARNETT, 2010).

Otto Busse, em 1895, mostrou em seu artigo células com parede celular espessa e, em 1896 descreveu com desenhos claros, a presença da cápsula. Em 1930, Arthur Henrici publicou um excelente desenho de um corte transversal de meninges infectadas por *C. neoformans* (*Torula histolytica*) mostrando grandes espaços capsulares em torno das células de levedura, o material capsular era evidentemente secretado pela levedura e não formado pelos tecidos. Benham não só descreveu a cápsula e incluiu desenhos delas em seu artigo como utilizou-as (retirados das células por tratamento com HCl) para produzir anticorpos aglutinantes, começando assim a caracterização antigênica desta espécie (BARNETT, 2010).

Até 1949, *C. neoformans* foi considerado uma espécie anamorfa homogênea (assexuada). Entre 1949 e 1960, Edward Evans e seus colegas publicaram uma série de artigos ampliando os estudos antigênicos de Benham. Três sorotipos foram descritos (A, B e C) com base nas diferenças antigênicas o polissacarídeo capsular, e 20 anos mais tarde, um quarto sorotipo (D) foi descoberto. Esta é a primeira evidência clara de que *C. neoformans* é taxonomicamente heterogêneo (BARNETT, 2010).

Em 1970, Vanbreuseghem e Takashio avaliaram um isolado atípico obtido de paciente com meningite criptocócica na República do Congo. Após experimentação animal, foram observadas formas atípicas, alongadas e até mesmo baciliformes, ao lado de células clássicas redondas, em razão disto, foi proposto que aquele isolado fosse denominado *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970).

Experimentos de reprodução conduzidos por Kwon-Chung no início dos anos 1970 revelaram duas espécies teleomorfas (sexuais) diferentes morfologicamente distintas: *Filobasidiella neoformans*, que resultou de um cruzamento entre duas linhagens sorotipo “D” e “C” de *C. neoformans* var. *neoformans*, e *Filobasidiella bacillispora*, caracterizadas por basidiósporos em forma de baciliforme de parede lisa, que resultou de um cruzamento entre duas linhagens de *C. neoformans* var. *gattii*, sorotipo “A” e um “B” (KWON-CHUNG, 1975).

De acordo com a classificação atual, o complexo de espécies compreende duas espécies denominadas *C. neoformans* (com duas variedades, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*) e *C. gattii* e cinco sorotipos A, D e AD para *C. neoformans* e B e C para *C. gattii*.

Em 2015, foi proposta uma nova taxonomia com a divisão de *C. neoformans* em duas espécies (*Cryptococcus neoformans* e *C. deneoformans*) e *C. gattii* em um total de cinco espécies (*Cryptococcus gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*) (HAGEN *et al*, 2015). No entanto, essa proposta ainda é tema de discussão entre a comunidade criptocócica e a taxonomia clássica continua sendo utilizada.

2.2 Criptococose

A criptococose é uma micose oportunista sistêmica que acomete órgãos internos e pele, causada por uma levedura capsulada pertencente ao gênero *Cryptococcus*. Apresenta-se de forma subaguda ou crônica, afetando pacientes imunodeprimidos, principalmente pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), doenças hematológicas e imunossupressão terapêutica, ou imunocompetentes (MITCHELL; PERFECT, 1995; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Os fatores de virulência clássicos de *C. neoformans* e *C. gattii* incluem a formação da cápsula, a produção de pigmentos de melanina, e a capacidade de crescer a 37°C (CASADEVALL, 1998; PERFECT, 2005; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A cápsula polissacarídica antifagocítica proeminente, que é composta de glucuronoxilomanana, é considerada um fator de virulência essencial que tem múltiplos efeitos na imunidade do hospedeiro e pode aumentar de tamanho com a exposição aos tecidos do corpo e fluidos (ZARAGOZA *et al*, 2010). A enzima que catalisa a conversão de compostos difenólicos para formar a melanina, pode ter um papel biológico para proteger as leveduras contra stresses oxidativos no hospedeiro e pode explicar parcialmente o neurotropismo do organismo para locais com altas concentrações das catecolaminas difenólicas. A capacidade de crescer a 37 °C é uma característica básica de virulência para os fungos mais patogênicos em seres humanos, e estudos moleculares ligaram o crescimento em altas temperaturas a múltiplas vias de sinalização e enzimas que esta levedura adquiriu ou adaptou ao longo do tempo para reter ou aumentar a sua patogenicidade em mamíferos. Outros fatores de virulência incluem fosfolipase e produção de urease e várias enzimas associadas com a proteção contra o estresse oxidativo, conferindo sobrevivência dentro do fagolisossomo (COELHO *et al*, 2014).

A criptococose ocorre principalmente por inalação dos propágulos infecciosos (células de levedura a ser mal encapsuladas ou basidiósporos) de reservatórios ambientais com deposição em alvéolos pulmonares (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A infecção pulmonar primária é geralmente assintomática ou minimamente sintomáticos apesar das altas taxas de reatividade sorológica em crianças em determinados ambientes urbanos. A eliminação da infecção pelo hospedeiro pode ocorrer, no entanto, em muitos indivíduos, após as leveduras se depositarem nos alvéolos, encontram macrófagos alveolares, que desempenham um papel central na resposta imunológica. A resposta do hospedeiro à infecção criptocócica envolve principalmente a uma resposta de células T

auxiliares com citocinas incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon- γ , e interleucina-2, resultando em uma inflamação granulomatosa (PERFECT, 2005). Em muitas circunstâncias, esta levedura vai estabelecer uma infecção latente nos fagolisossomos, como leveduras inativas (ainda viáveis) dentro dos linfonodos torácicos ou em um granuloma pulmonar, que pode persistir em um indivíduo assintomático durante anos. Quando a imunidade local é suprimida, a levedura pode crescer e difundir fora destes complexos de nódulos linfáticos pulmonares semelhantes para a patofisiologia que se observa em casos de reativação na tuberculose ou histoplasmose (SUN *et al*, 2010; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

C. neoformans e *C. gattii* têm uma grande predileção para o estabelecimento nos pulmões e sistema nervoso central. Outros locais de infecção menos frequentes incluem a pele, próstata, olhos, ossos e articulações, podendo se disseminar amplamente e infectar a maioria dos órgãos em pacientes gravemente imunossuprimidos e, portanto, podendo aparecer em qualquer local do corpo humano (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

No Amazonas, 70% das infecções são causadas por *C. neoformans*, atingindo principalmente jovens (16 a 30 anos) e que foram infectados pelo HIV. As infecções por *C. gattii* atingem todas as faixas etárias, mas a maioria dos pacientes não estão infectados pelo HIV (SILVA *et al*, 2012; FREIRE *et al*, 2012).

2.2.1 Diagnóstico

A escolha da metodologia que leve ao diagnóstico laboratorial depende da suspeita clínica e de vários aspectos clínico-epidemiológicos que devem ser levados em conta pelo médico (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2010).

O diagnóstico definitivo da criptococose é realizado através do isolamento de *Cryptococcus* a partir de uma amostra clínica. Os resultados do exame microscópico direto em

fluidos corporais utilizando tinta nanquim, exames histopatológicos e a triagem sorológica com a correta interpretação dos resultados laboratoriais, orientam para decisão terapêutica inicial. Os resultados das culturas podem confirmar ou alterar esta decisão (COLOMBO *et al*, 2014). Métodos moleculares, apesar de estarem disponíveis e serem amplamente utilizados para fins de investigação, não são utilizados atualmente na prática clínica de rotina (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

2.2.1.1 Exame direto e cultivo

O exame direto é o método mais rápido para o diagnóstico da criptococose. A preparação utilizando tinta nanquim permite a visualização de *Cryptococcus* como uma célula leveduriforme, encapsulada, globular, com ou sem brotamento com tamanho variando de 5 a 20µm em diâmetro (COLOMBO *et al*, 2014; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

O isolamento em meio de cultura é necessário para confirmação de diagnóstico especialmente em amostras provenientes de trato respiratório, urinário e digestivo, onde outras leveduras capsuladas não patogênicas do gênero *Cryptococcus* podem ser encontradas. Para o cultivo, utiliza-se o meio Sabouraud (sem cicloheximida), podendo ser utilizado também o meio de semente de niger com antibióticos (NSA-clorafenicol), em amostras como escarro e urina, sabidamente contaminados (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2010).

Em meio Sabouraud, são observadas, após 48 a 72 horas de incubação a 30-35°C em condições aeróbias, colônias brancas-a-creme, opacas, ou mucoides com aspecto de leite condensado. Em NSA, observam-se leveduras lisas, úmidas, brilhantes, mucóides de coloração marrom-escura, devido à ação da enzima fenol-oxidase que atua sobre substratos fenólicos existentes no meio, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. Esta fica retida na parede celular do fungo,

sendo responsável pela expressão do pigmento escuro mostrado pelas colônias (CASADEVALL, 2000).

A aparência mucóide da colônia está relacionada com o tamanho da cápsula em torno das leveduras. Apesar do crescimento relativamente rápido para a maioria das cepas, as culturas devem ser mantidas por até 4 semanas, particularmente para pacientes que receberam tratamento antifúngico (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Após isolamento, é recomendado utilizar o teste bioquímico em meio de L-canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) para diferenciar as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (KWON-CHUNG; POLACHECK; BENNETT, 1982).

O método consiste na alteração do pH do meio (passando de amarelo esverdeado, para azul, possível devido a presença do indicador azul de bromotimo) ocasionada pela assimilação de glicina como única fonte de carbono e resistência à l-canavanina por *C. gattii*. Fato este não observado para as espécies de *C. neoformans*, devido à sensibilidade a canavanina e baixa capacidade de assimilar glicina (MIN; KWON-CHUNG, 1986).

2.2.1.2 Métodos sorológicos

A pesquisa de antígenos através de testes de antígeno (aglutinação em látex [LA] ou imunoensaio enzimático[EIA]) em soro e/ou líquido tem muitas vantagens sobre a cultura e microscopia, devido a alta especificidade e menor tempo, mas muitas limitações os tornam menos viável em locais com recursos limitados. O ensaio LA é um teste relativamente simples, que proporciona alta sensibilidade e especificidade, mas seu uso em países de baixa renda pode ser limitado pela necessidade de infraestrutura laboratorial (TANNER *et al*, 1994). EIA, por outro lado, exige conhecimentos de laboratório e infraestrutura mais avançados. Ambos LA e EIA são mais caros do que a microscopia e cultura, necessitam armazenamento sob

refrigeração, e alguma infraestrutura, tornando menos prováveis de uso em laboratórios simples, limitando uso a grandes laboratórios de referência e diagnóstico (VANSELOW; BRANDT; PARK, 2012).

Um novo ensaio de antígeno criptocócico (CrAg), chamado de ensaio de fluxo lateral (LFA; Imuno-Mycologics, Norman, OK, EUA), foi recentemente aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para uso no soro. O LFA é capaz de identificar a presença de antígeno criptocócico, usando tiras de teste imunocromatográficas revestidas com anticorpos monoclonais específicos de *Cryptococcus* e partículas de ouro. Este novo teste tem o potencial para ser usado em locais onde considerações logísticas e técnicas se opõem à utilização de outros testes, não necessita de refrigeração ou equipamento de laboratório avançado e pode ser armazenado à temperatura ambiente até um ano. O LFA é tão simples de ler quanto um teste de gravidez e requer um mínimo de treinamento, podendo ser realizado por qualquer pessoa (PELFREY; BAUMAN, 2012;).

As tiras de teste são colocadas em um microbuto contendo uma gota de soro, plasma, sangue total ou LCR diluído e incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, sem qualquer tratamento prévio. Um resultado positivo ocorre quando duas bandas (controle e de teste) são observadas na zona de ensaio, e o resultado negativo é indicado com a presença de uma única banda (controle) (PELFREY; BAUMAN, 2012). Williams *et al* (2015), demonstraram a concordância entre sangue total, soro e plasma e demonstraram que a punção digital pode ser utilizada para um diagnóstico confiável.

CrAg é detectável no soro em média 3 semanas antes do início dos sintomas de meningite criptocócica, tornando possível o rastreamento do antígeno no soro e o subsequente tratamento dos pacientes com teste positivo (FRENCH *et al*, 2002).

Em contraste com os títulos de valor diagnóstico, a titulação em soro ou líquido não são úteis no acompanhamento da resposta à terapêutica, como a correlação entre as mudanças no título e progressão clínica ou respostas micológicas. Os títulos permanecem elevados por períodos prolongados (8 meses a 1 ano) (CHEN *et al*, 2012). Por isso, os resultados CRAG devem sempre ser interpretados em conjunto com a avaliação clínica. O lugar do LFA no diagnóstico da criptococose ainda está para ser esclarecido, mas é provável que ocupe um papel importante, dada a sua simplicidade e precisão até agora (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014).

2.3 Testes de susceptibilidade a antifúngicos

Um tratamento eficaz de infecções fúngicas do sistema nervoso central depende essencialmente do estado imunológico do hospedeiro e escolha da terapêutica antifúngica. Classicamente, o tratamento com Anfotericina B sozinha ou em combinação com 5-flucitosina tem sido recomendada para meningite criptocócica (MORAES,2003; KHAN, 2007; SIDRIM, 2010).

A indução de variantes resistentes a antifúngicos é considerada um fenômeno raro, quando comparado com a mesma dinâmica no que se refere à relação bactéria-antibacteriano, visto que não há conhecimento de elementos genéticos que codifiquem resistência a antifúngicos e que possam ser transferíveis de fungo a fungo, como ocorre entre as bactérias. Há consenso na literatura sobre o aumento na incidência das micoses sistêmicas e mudança no espectro de microrganismos causadores dessas micoses. Além disso, novas opções terapêuticas foram desenvolvidas, e há relatos de resistência de fungos às drogas disponíveis comercialmente (PFALLER, 1992; PAPPALARDO, 2003).

Os testes utilizados na avaliação *in vitro* da atividade antifúngica, são derivados dos métodos utilizados na avaliação da atividade de antibacterianos. De modo geral, as técnicas mais utilizadas são: diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar.

O Etest® (BioMérieux) é um método bem estabelecido para testar a resistência antimicrobiana e determinar a escala em Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos, agentes antifúngicos e agentes antimicobacterianos. Consiste em uma fita plástica contendo droga em diferentes concentrações expressas no reverso da tira. Reúne a vantagem da simplicidade de métodos baseados na difusão em ágar, com as informações quantitativas fornecidas pelo método de diluição (PETROU, 2000; SIDRIM, 2010).

Até o momento, os métodos de referência disponíveis para determinar a susceptibilidade *in vitro* contra as drogas antifúngicas, o M27-A3 and EDef 7.2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, respectivamente, não incluem pontos de corte para qualquer droga antifúngica contra isolados de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (CLSI M27-A3, 2008; EUCAST EDef 7.2, 2012). Assim, as categorias sensível/resistente não devem ser utilizadas devido à ausência de pontos de interrupção interpretativos para estas leveduras (CÓRDOBA *et al*, 2016).

Espinel-Ingroff *et al* (2012a, 2012b) propõem *Epidemiological Cutoff Values (ECV)* espécie-específicos para anfotericina B, flucitosina (2012a), fluconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol (2012b), contra *C. neoformans* e *C. gattii*. Os valores propostos para *C. neoformans* (VNI) são: anfotericina B, 0,5µg/mL; flucitosina, 8µg/mL; fluconazol, 8µg/mL; itraconazol, 0,25µg/mL; posaconazol, 0,25µg/mL; e voriconazol 0,25µg/mL. Para *C. gattii* (VGII) são propostos: 1,0µg/mL para anfotericina B; 16µg/mL para flucitosina; 32µg/mL para fluconazol; 0,5µg/mL para itraconazol; 0,5µg/mL para posaconazol; e 0,25µg/mL para voriconazol.

Pfaller *et al.*, (2005) avaliaram as tendências mundiais de susceptibilidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* no período de 1990 a 2004 em que foram testados 1.811 isolados de 100 centros médicos de 5 regiões geográficas diferentes. Este estudo constatou que os isolados da África, América Latina, Europa e do Pacífico são mais sensíveis ao Fluconazol que isolados da América do Norte.

2.4 Ecologia

A descoberta de possíveis nichos ecológicos iniciou em 1951, quando Emmons ao avaliar 716 amostras de solo foi capaz de isolar 4 cepas de *Cryptococcus neoformans*. Esta é a primeira evidência de que *C. neoformans* está presente no solo, constituindo o ponto de partida para muitos estudos que realizaram o isolamento de *C. neoformans* de dejetos dos animais e, mais especificamente, excrementos de pássaros, além de servir para explicar a origem da infecção em casos de criptococose meníngea em que foi demonstrada uma lesão pulmonar primária (EMMONS, 1951).

Em 1954, Emmons isola 20 cepas de *C. neoformans* de 1.751 amostras de solo. Entre as 20 amostras positivas, 8 eram de solo contaminado com excretas de pombos e 5 de solo onde os pombos frequentemente eram vistos. Assim, as excretas de pombos passam a ser a fonte mais importante de *C. neoformans* (EMMONS, 1954).

A partir de então, diversos autores isolam *C. neoformans* de solo enriquecido com excretas de galinhas (AJELLO, 1958), e excretas de canários (STAIB, 1961), rolinhas (TSURUBA, 1962), pardais (LEONE, 1969) e, principalmente pombos (EMMONS, 1955; KAO, 1959; LITTMAN, 1959).

Nos anos 60, Emmons concluiu que o pombo não é o hospedeiro de *C. neoformans* e descreve a relação entre a levedura e as excretas de pombos como um "acontecimento acidental em um meio adequado", por crescer como saprófito nas excretas de pombos e poder ser isolado a partir da maioria das amostras coletadas em áreas rurais ou urbanas (EMMONS, 1960;1969).

A principal fonte ambiental de *C. neoformans* havia sido elucidada, como sendo excrementos de aves, entretanto a fonte ambiental de *C. gattii* manteve-se desconhecida até os anos 1990, quando Ellis & Pfaller (1990) conseguem isolar *C. gattii* de *Eucalyptus camaldulensis*.

Após oito meses de monitoramento em larga escala de amostras de ar, solo e vegetação, e analisar 2.100 amostras na área do Vale Barossa, *C. gattii* foi isolado a partir de restos de plantas coletadas sob a copa de árvores de *E. camaldulensis*, sendo isolado repetidas vezes apenas a partir de material relacionado com *E. camaldulensis*, incluindo madeira, casca, folhas e detritos acumulados que se encontravam sob a copa das árvores. Todos os outros materiais de plantas e solos coletados foram negativos, indicando uma associação específica entre *C. gattii* e *E. camaldulensis* (ELLIS; PFALLER, 1990). Os autores observaram que o aparecimento de *C. gattii* no ambiente parecia coincidir com a floração das árvores de *E. camaldulensis* sugerindo que a dispersão de *C. gattii* pode ocorrer em concomitância final da primavera com o florescimento de seu hospedeiro natural.

Levando em conta o achado, os autores propõem que *C. neoformans* é uma levedura epífitas que desenvolve uma associação biotrófica específica com uma planta hospedeira; onde a dispersão dos basidiósporos ocorre simultaneamente ao florescimento da planta hospedeira, geralmente no final da primavera ou início do verão, onde os basidiósporos ficam presentes no ambiente por períodos curtos de tempo, possivelmente, apenas alguns dias, tempo suficiente para sintetizar o material capsular e passar por uma transformação de tornando-se uma levedura

encapsulados. As células presentes em detritos no solo ou plantas expostas às intempéries serão eliminados do ambiente pela ação da luz solar e outros microrganismos, mas aquelas que ficarem abrigados em restos de plantas, protegidos, poderão permanecer viáveis por vários anos. Animais e aves que tenham contato com a planta hospedeira podem eliminar *Cryptococcus* em suas excretas, e excretas acumuladas em lugares protegidos, podem agir como um vetor para a dispersão de células de leveduras ressecadas, que também são infecciosas para seres humanos e animais (ELLIS; PFALLER, 1990b).

Nos anos seguintes, *C. gattii* foi isolado de diferentes espécies de árvores, incluindo diferentes espécies de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus tereticornis*) (PFEIFFER; ELLIS, 1991;1992), principalmente em regiões tropicais e/ou subtropicais.

No Brasil, diversos autores descrevem o isolamento de *C. neoformans* em fontes ambientais como solo, excretas e ninhos de pombos (SILVA, 1960; SILVA; PAULA, 1963; ROGERS; BENEKE, 1964; MELO *et al*,1987; MACHADO *et al*, 1993) distribuídas pela Bahia, São Paulo, Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Porto Alegre.

Lazéra *et al* (1993) descrevem o isolamento de *C. neoformans* no Rio de Janeiro em diversas fontes ambientais incluindo habitats de morcegos, ninhos de pombos, oco de jamelão (*Eugenia jambolana*), e poeira de uma casa abandonada. Os autores isolaram ainda, *C. gattii* de poeira recolhida em sótão de uma casa abandonada, onde havia acúmulo de guano de morcegos.

Entre os anos de 1995 e 1998, *C. neoformans* foi isolado de cássia rosa (*Cassia grandis*), figueira (*Ficus microcarpa*) e aleluia (*Senna multijuga*) e *C. gattii* foi isolado de oiti (*Moquilea tomentosa*) demonstrando não haver relação entre o fungo e uma árvore específica (LAZERA *et al*, 1996;1998).

Diversos ambientes têm sido investigados como possíveis fontes de infecção de *Cryptococcus*, trabalhos relatam o isolamento de *C. neoformans* a partir de abelhas (ERGIN *et al*, 2004), besouros (BARONI *et al*, 2006), baratas (SWINNE, 1986; SOUZA, 2011), formigas (de JESUS *et al*, 2012), guano de morcego (MONTAGNA *et al*, 2003), e diferentes espécies de árvores como *Senna siamea* (COSTA *et al*, 2009), *Persia gratissima* (PASSONI *et al*, 1998), *Ceratonia siliqua* (COLOM *et al*, 2012) e *Hymenaea courbaril* (CASTRO E SILVA *et al*, 2015). Já *C. gattii* foi isolado de excretas de Psittaciformes (ABEGG *et al*, 2006), solo, água, ar (MACDOUGALL, 2007) e árvores como *Senna siamea* (COSTA *et al*, 2009), *Ceratonia siliqua*, *Pinus halepensis*, *Prunus* sp. (COLOM *et al*, 2012), *Caesalpinia coriaria* (HAGEN *et al*, 2014) e *Plathymenia reticulata* (ANZAI *et al*, 2015).

Poucos são os trabalhos que avaliam a presença de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* em poeira domiciliar. O primeiro estudo de que se tem relato, é o de Swinne *et al* (1986) que isolou *C. neoformans* em poeira domiciliar na República do Congo, assim como Passoni *et al* (1998) no Rio de Janeiro. Costa (2008) isolou *C. neoformans* e *C. gattii* no Pará e, Brito-Santos *et al* (2015) isolou *C. gattii* no interior do Amazonas.

2.5 Métodos moleculares

Vários métodos moleculares tem sido desenvolvidos para diferenciar geneticamente as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, dentre eles destacam-se: PCR *fingerprinting* que utiliza *primers* específicos como microssatélites (M13 ou (GACA)₄), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD, do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) análise de polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado (AFLP, do inglês *Amplified Fragment Length Polymorphism*), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês

Restriction Fragment Length Polymorphism) da região *URA5*, e mais recentemente a tipagem por sequenciamento por multilocus (MLST, do inglês *Multi-Locus Sequence Typing*) (VARMA; KWON-CHUNG, 1992; CHEN *et al*, 1996; MEYER *et al*, 1993; 2003; 2009; BOEKHOUT *et al*, 2001). Quanto aos tipos moleculares, *C. neoformans* foi agrupado em AFLP1/VNI e AFLP1A/VNII (sorotipo A), AFLP3/VNIII (sorotipo AD) e AFLP2 / VNIV (sorotipo D), enquanto *C. gattii* foi agrupado em AFLP1/VIG, AFLP6/VGII, AFLP5/VGIII e AFLP7/AFLP10/VGIV (sorotipos B e C) (MEYER *et al*, 2009).

A fim de tentar padronizar globalmente a genotipagem do complexo de espécies *C. neoformans/C. gattii*, um esquema MLST foi criado pelo grupo de trabalho "Genotipagem *C. neoformans* e *C. gattii*" do ISHAM com base em regiões variáveis de sete loci genéticos independentes: cápsula de polissacárido (CAP59), glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1), lacase (LAC1), fosfolipase B1 (PLB1), superóxido dismutase (SOD1), pirofosforilase monofosfato de orotidina (URA5) e o gene espaçador da região intergênica (IGS1), aproveitando o alto poder discriminatório e boa reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. O alelo (AT) e tipos de sequência (ST) podem ser determinados através do banco de dados disponível em <http://mlst.mycologylab.org/>. (MEYER *et al*, 2009)

Todos os tipos moleculares, exceto VGIV são encontrados no Brasil, sendo VNI o mais encontrado (64%), seguido por VGII (21%), VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3% de cada), e VNIII (<1%) (TRILLES *et al*, 2008). Nas regiões norte/nordeste, os tipos moleculares mais frequentes (VNI, VGII, VNIV e VGIII) diferem da região sul/sudeste onde são encontrados todos os tipos moleculares. Na região Norte do Brasil, apenas os tipos moleculares VNI, VNII e VGII foram encontrados, o que parece estar relacionado a algum tipo de padrão endêmico regional (TRILLES *et al*, 2008).

No Amazonas, estudos avaliaram os genótipos em indivíduos de uma unidade de saúde,

havendo predomínio do tipo VNI, seguido de VGII e VNII (SILVA *et al*, 2012; FREIRE *et al*, 2012).

Alves *et al* (2016) no período de junho de 2012 a janeiro de 2014 avaliaram 506 amostras ambientais na cidade de Manaus. Foram coletadas 255 amostras de árvores, 191 de excretas de pombos e 60 excretas de aves mantidas em cativeiro, destas 9 amostras de excretas de pombos e 3 de aves em cativeiro foram positivas para *Cryptococcus neoformans* (VNI) e uma amostra de árvore para *C. gattii* (VGII).

Brito-Santos *et al* (2015) isolaram de poeira domiciliar na região de Santa Isabel do Rio Negro (AM), *C. gattii* tipo molecular VGII e encontraram os ST's 5, 7, 20, 264, ST265, ST266, ST267 e ST268. Este foi o primeiro trabalho que descreve o perfil alélico no Amazonas para isolados de *C. gattii*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a presença de agentes da criptococose em moradores e moradias de uma comunidade rural do Amazonas e, caracterizar os isolados ambientais quanto à diversidade genética e susceptibilidade a antifúngicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em poeira domiciliar de residências de uma comunidade rural do Amazonas;
- Determinar a diversidade genética de *Cryptococcus* isolados de poeira domiciliar pela técnica de tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST);
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos isolados de *Cryptococcus* a antifúngicos azóis e Anfotericina B;
- Investigar se os moradores das residências positivas para *Cryptococcus* estão infectados por esse agente patogênico.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal o qual é parte do projeto “ASPECTOS SÓCIO AMBIENTAIS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS NA COMUNIDADE RURAL DO LIMÃO, MUNICÍPIO DE IRANDUBA - AM” Chamada Pública PROEP/FAPEAM n. 001/2014. Este foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas e está aprovado com o CAAE- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética N. 41067414.6.0000.5020 (ANEXO A).

4.2 População e Local de Estudo

O estudo foi realizado na “Comunidade Lago do Limão” localizada a 30Km de Manaus, zona rural do município de Iranduba, área metropolitana de Manaus. A amostragem para a seleção ocorreu de forma aleatória simples. As pessoas que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram visitadas 103 residências e as coletas foram realizadas em duas fases, cheia (nov/14 a jun/15) e vazante (set/15 a dez/15).

4.3 Obtenção dos isolados

Em cada residência foram coletadas amostras de poeira domiciliar contendo cerca de 10g acondicionadas em sacos plásticos estéreis e levadas em caixas isotérmicas ao Laboratório

de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ para processamento.

O processamento foi realizado usando cerca de 1g da amostra, macerada e colocada em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de salina estéril a 0,9%. A amostra foi agitada por 5 min e deixada em repouso por 30 min. A seguir 0,1 mL foi plaqueado em placas de Petri contendo ágar semente de níger (NSA) com cloranfenicol. Foram feitas 10 placas para cada amostra e as placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias, sendo a leitura realizada a cada 24h. As colônias lisas, úmidas, brilhantes e de coloração marrom-escura foram subcultivadas em meio NSA para purificação e identificação.

4.4 Identificação dos isolados

As colônias isoladas foram repicadas para o meio Ágar Sabouraud para realização das provas de identificação. A microscopia foi feita em montagens com lactofenol azul de algodão. Leveduras de tamanho regulares, globosas, arredondadas, encapsuladas, unibrotantes ou multibrotantes e sem hifas ou pseudohifas, foram submetidas aos testes fisiológicos como termotolerância a 37°C, sensibilidade à cicloheximida e crescimento no meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).

Foi estimada numericamente a quantidade de propágulos de *Cryptococcus* existentes em cada amostra positiva, expressa em unidades formadoras de colônias do fungo por grama de matéria orgânica processada (UFC/g).

4.4.1. Identificação molecular das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* isoladas

Todos os isolados obtidos em cada amostra foram caracterizados molecularmente por RFLP. Para avaliação de multilocus, foram selecionados aleatoriamente um isolado de cada tipo molecular de cada amostra.

4.4.1.1 Extração de DNA:

Extração do DNA de *Cryptococcus* foi realizado utilizando o conjunto de extração DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) que utilizam a tecnologia de ligação do DNA com colunas de sílica. Foi utilizada a metodologia descrita pelo fabricante.

4.4.1.2 RFLP-PCR

Foi realizada como descrito por Meyer *et al*, 2003. Amplificação do gene *URA5* foi conduzida com um volume final de 50 μ L. Cada reação continha 50 ng de DNA, tampão PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂; Invitrogen), 0,2 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Invitrogen), 3 mM de Acetato de Magnésio; 1,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), e 50 ng de cada primer *URA5* (5'-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3') e *SJ01* (5'-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3'). A amplificação foi realizada no termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido por um ciclo de extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram duplamente digeridos com *Sau96I* (10 U/ μ L) e *HhaI* (20 U/ μ l) durante 3 horas, e separados por eletroforese em gel agarose 3% a 100 V. Os padrões de RFLP foram atribuídos visualmente comparando-os com os padrões obtidos a partir das cepas-padrão (VNI-VNIV e VGI-VGIV). Um conjunto de oito cepas-padrão de laboratório, representando cada um dos oito tipos moleculares previamente definidos: WM148 (sorotipo A), VNI/AFLP1; WM626

(sorotipo A), VNII/AFLP1A; WM628 (sorotipo AD), VNIII/AFLP3; WM629 (sorotipo D), VNIV/AFLP2; WM179 (sorotipo B), VGI/AFLP4; WM178 (sorotipo B), VGII/AFLP6; WM161 (sorotipo B), VGIII/AFLP5; e WM779 (sorotipo C), VGIV/AFLP7 foram incluídos para designar o tipo molecular e assegurar a reprodutibilidade.

4.4.2. Tipagem molecular por sequenciamento de multilocus (MLST)

O polimorfismo molecular dos isolados e a identificação dos subtipos foi realizado pela técnica de MLST de acordo com Meyer *et al* (2009). Para a amplificação dos genes *URA5*, *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1* e a região IGS foram utilizados 50ng de DNA em um volume final de 50 μ L, com 1X do tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl); 0,2 mM de cada nucleotídeo; 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 50 ng do iniciador senso e 50 ng do anti-senso (ANEXO B) e 2,5U da enzima Platinum® Taq Polymerase (Invitrogen, Brasil).

A visualização do amplificado foi realizada sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 1,4%, em uma corrida a 100V, utilizando padrão de peso molecular de 100pb, corado com *syber safe* 4ng/ μ L.

A purificação do amplificado, para a remoção de dímeros de *primer* e pequenos fragmentos de DNA, foi realizada de acordo com protocolo kit de purificação de DNA (PROMEGA).

O sequenciamento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do Kit BigDye® Terminator v3.1. A eletroforese capilar foi realizada pelo sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer na Plataforma de Genômica RPT01H do ILMD da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) da Fiocruz.

4.4.2.1 Análise de dados do Sequenciamento

As sequências obtidas na forma de eletroferogramas foram alinhadas utilizando o Programa Geneious v.9.0.1 e comparadas com os dados disponíveis no banco de dados do MLST (<http://mlst.mycologylab.org>).

O programa eBURST v3 foi utilizado para identificar o provável ancestral comum entre os complexos clonais para estabelecer possíveis relações evolutivas entre as cepas de cada espécie.

4.5 Teste de susceptibilidade a antifúngicos

O perfil de susceptibilidade foi realizado utilizando fitas de Etest[®] (Biomérieux, Marcy L'Étoile, França) e os agentes antifúngicos utilizados foram: Anfotericina B, Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Posaconazol. As fitas testes possuem concentração do gradiente de 0,016 a 256µg/mL para Fluconazol e 0,002 a 32µg/mL para Anfotericina B, Itraconazol, Posaconazol e Cetoconazol. As fitas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

Foram utilizadas placas de Petri de 140 mm de diâmetro contendo Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América), suplementado com 1,5% m/v de ágar e 2% m/v de glicose e, tamponado a pH 7,00 ±0,01 com Ácido 3N-Morfolinopropanossulfônico – MOPS (Sigma) com espessura de 0,4cm ±0,1.

O inóculo foi preparado a partir de colônias de *Cryptococcus* cultivadas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) após 72 horas de crescimento e homogeneizado em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85% para turvação 1 da Escala de McFarland. Um *swab* estéril não tóxico foi imerso na suspensão do inóculo e utilizado para realizar a semeadura. Quando

a superfície da placa estava completamente seca as fitas de Etest[®] foram aplicadas cuidadosamente.

As placas foram incubadas em estufa em câmara úmida a 35° C por 72 h. Após esse período foi realizada a leitura da CIM total no ponto de intersecção entre a elipse de inibição e a fita.

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados pelo programa WHONET 5.6 (WHO, Genebra, Suíça). Este programa foi desenvolvido e disponibilizado gratuitamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como parte do Programa de Monitoramento de Resistência Microbiana. Com este programa foi calculada, CIM90 e Média Geométrica. Estes dados foram comparados com os dados de cepas de amostras ambientais disponíveis na literatura.

4.6 Avaliação da presença de antígenos CrAg LFA

A presença do antígeno criptocócico nos moradores das casas onde houve isolamento de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* foi avaliada utilizando o kit CrAg[®] LFA por punção digital conforme Williams *et al* (2015). Foram convidados a realizar o exame, apenas os moradores que tinham idade igual ou superior a 18 anos.

A polpa do dedo anelar foi esterilizada com um algodão embebido em álcool 70% (v/v), e uma lanceta (Safe-T-Pro Uno, Accu-Chek, Roche Diagnostics GmbH) foi usada para fazer uma punção e produzir uma gota de sangue total. O dedo do paciente foi rapidamente colocado diretamente sobre a ponta da tira de teste de LFA de modo que a amostra de sangue (aproximadamente 40 µL) podia ser absorvido diretamente sobre a tira de LFA. A tira de teste

foi então colocada em um tubo de Eppendorf de 1,5 ml, contendo 1-2 gotas de diluente da amostra, e incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos. As fitas foram lidas na presença do paciente.

5 RESULTADOS

No período entre Novembro de 2014 e Dezembro de 2015 foram realizadas coletas de poeira domiciliar em 103 residências da comunidade Lago do Limão, sendo 92 no período da cheia e 84 no período da vazante. Em 71 residências foram feitas as coletas nos dois períodos (figura 1).

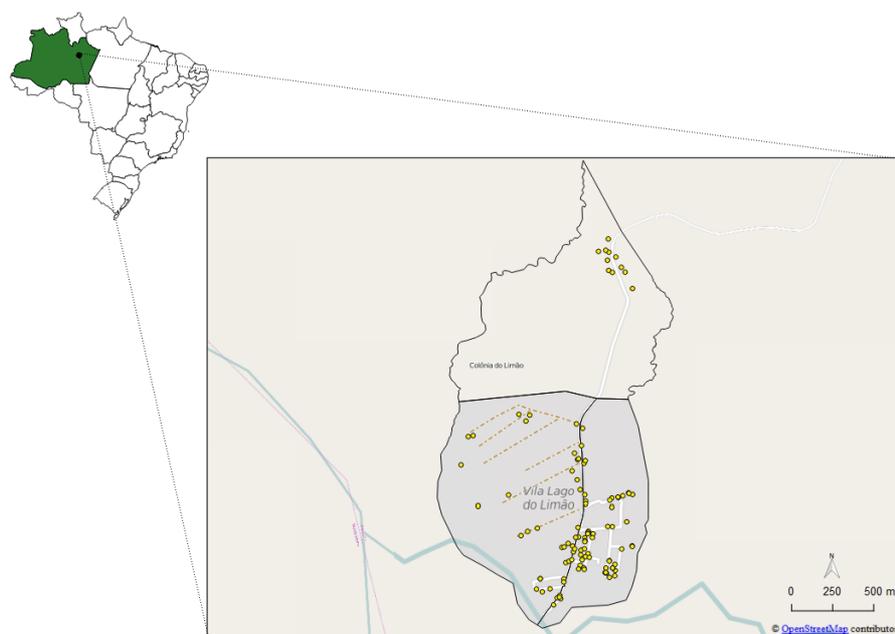


Figura 1: Espacialização das coletas de poeira domiciliar na comunidade Lago do Limão, Iraduba, AM.

Do total de 103 casas visitadas, de 12 residências (11,3%) foi possível realizar o isolamento do complexo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii*. Houve uma concentração das amostras positivas na sede da comunidade, onde há um maior aglomerado populacional, como pode ser observado na figura 2.



Figura 2: Distribuição das amostras de poeira domiciliar positivas para a presença de *Cryptococcus* na comunidade Lago do Limão, Iraduba, AM.

Todas as residências visitadas tinham características similares (tabela 1). As características das residências que tiveram resultado positivo para isolamento de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* estão descritas na tabela 2.

Tabela 1: Características das casas visitadas na comunidade Lago do Limão, Iraduba, Amazonas.

Variáveis	Resultado		P valor
	Positivo	Negativo	
	n = 12 (%)	n = 91 (%)	
Tipo de casa			0.582
madeira	2 (16.7)	13 (14.3)	
Mista	6 (50)	33 (36.3)	
Tijolo	4 (33.3)	45 (49.5)	
Presença de animais			0.756
Sim	7 (58.3)	58 (63.7)	
Não	5 (41.7)	33 (36.3)	
Área alagada			1
Sim	2 (16.7)	14 (15.4)	
Não	10 (83.3)	77 (84.6)	

Tabela 2: Características das casas com poeira domiciliar positiva na comunidade Lago do Limão, Iranduba, Amazonas.

ID	Sofre alagação com a cheia?	Tipo de construção	Tipo de assoalho	Presença de árvore em peridomicílio	Presença de aves em cativoiro
LL04	Sim	Mista (Tijolo e madeira)	Madeira	Não	Não
LL10	Sim	Madeira	Madeira	Sim	Não
LL21	Não	Mista (Tijolo e madeira)	Piso/cerâmica	Não	Não
LL37	Não	Tijolo	Piso/cerâmica	Sim	Não
LL39	Não	Madeira	Madeira	Sim	Não
LL43	Não	Mista (Tijolo e madeira)	Piso/cerâmica	Sim	Não
LL44	Não	Madeira	Alvenaria	Não	Não
LL56	Não	Alvenaria	Piso/cerâmica	Sim	Não
LL65	Não	Alvenaria	Piso/cerâmica	Não	Não
LL67	Não	Alvenaria	Piso/cerâmica	Sim	Não
LL69	Não	Mista (Tijolo e madeira)	Piso/cerâmica	Sim	Sim
LL106	Não	Mista (Tijolo e madeira)	Piso/cerâmica	Sim	Não

Todas as colônias foram isoladas e feitos os testes bioquímicos. Foram observadas as seguintes características: todas foram capazes de produzir melanina em NSA (atividade fenol-oxidase), crescimento à 37°C, sensíveis à cicloheximida e em CGB foram encontrados isolados positivos e negativos (resultado positivo - alteração da coloração do meio para azul; resultado negativo- sem alteração da coloração), caracterizando assim isolados pertencentes às espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

Esses isolados foram então submetidos para a determinação do tipo molecular, sendo identificados como pertencentes aos tipos VNI e VGII. Em duas amostras de poeira foram encontrados concomitantemente os tipos moleculares VNI e VGII (tabela 3). Informações detalhadas estão disponíveis no anexo C.

Tabela 3: *Cryptococcus* obtidos em isolamento de poeira domiciliar na comunidade Lago do Limão, Iranduba, Amazonas.

ID	Coleta na cheia		Coleta na vazante	
	Espécie	UFC/g	Espécie	UFC/g
LL04	<i>C. gattii</i> (VGII)	1,002x10 ³ (1:1)	N/C	-
LL10	<i>C. gattii</i> (VGII)	1,059 x10 ³	Negativo	0
LL21	<i>C. gattii</i> (VGII) e <i>C. neoformans</i> (VNI)	1,002 x10 ⁴ (1:19)	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,46 x10 ²
LL37	Negativo	0	<i>C. gattii</i> (VGII)	2,106 x10 ³
LL39	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,115 x10 ²	N/C	-
LL43	<i>C. neoformans</i> (VNI)	1,575 x10 ³	Negativo	0
LL44	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,20 x10 ²	N/C	-
LL56	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,09 x10 ²	Negativo	0
LL65	<i>C. gattii</i> (VGII) e <i>C. neoformans</i> (VNI)	4,192 x10 ³ (1:3)	N/C	-
LL67	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,105 x10 ²	Negativo	0
LL69	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,095 x10 ²	Negativo	0
LL106	N/C	-	<i>C. neoformans</i> (VNI)	5,335 x10 ²

Legenda: UFC, Unidade formadora de colônia; N/C, não coletado.

A análise do MLST, foi realizada para 1 isolado de cada espécie, obtido em cada amostra, totalizando 15 cepas. Destas 15 cepas em 7, sendo 4 de *C. gattii* e 3 de *C. neoformans* foi possível sequenciar todos os genes, sendo encontrados novos alelos para os genes *CAP59*, *GPD*, *IGS*, *PLB* e *SOD*. Nas demais amostras, devido a inconsistências no sequenciamento de algum gene (problemas no alinhamento dos *primers*, obtenção de sequencias ruins), não foi possível definir o ST (Ver anexo D). A tabela 4 descreve os alelos e ST's encontrados para os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Por meio da análise com o programa eBurst, com os dados disponíveis no banco de dados do MLST, dois isolados de *C. neoformans* se agruparam em um complexo clonal (LL56 – ST 93 e LL39 - ST Novo). Um isolado de *C. gattii* não possui um ancestral definido (LL10 – ST 46) mas se agrupa com o ST 346. Os demais isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii* foram identificados como *singletons*, ou seja, não possuem nenhuma ligação com outro ST já identificado. Esses grupos estão representados nas figuras 3 e 4.

Tabela 4: Alelos e STs encontrados em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* isolados de poeira domiciliar, na comunidade Lago do Limão, Iranduba, AM.

Amostra	Espécie	CAP59	GPD1	IGS1	LAC1	PLB1	SOD1	URA5	ST
LL04.2	<i>C. gattii</i>	Novo	21	Novo	21	19	87	2	Novo
LL10	<i>C. gattii</i>	26	6	4	28	2	27	2	46
LL37.1	<i>C. gattii</i>	Novo	21	28	21	19	87	2	Novo
LL65.1	<i>C. gattii</i>	27	6	Novo	4	1	Novo	2	Novo
LL21.1	<i>C. neoformans</i>	1	Novo	25	3	Novo	1	1	Novo
LL39	<i>C. neoformans</i>	1	Novo	10	3	4	1	1	Novo
LL56	<i>C. neoformans</i>	1	23	10	3	4	1	1	93

Foram avaliados 13 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* quanto à susceptibilidade a antifúngicos utilizando E-test. A leitura foi realizada no ponto de intersecção entre início do halo de inibição e a fita. Os resultados detalhados estão descritos na tabela 5.

Para calcular a Concentração Inibitória Mínima 90 (CIM₉₀), e Média Geométrica, foi utilizado o valor correspondente a 100% de inibição do crescimento fúngico. Os resultados de CIM₉₀ e Média Geométrica para os isolados de *C. neoformans* e os isolados de *C. gattii* estão descritos nas tabelas 6 e 7 respectivamente.

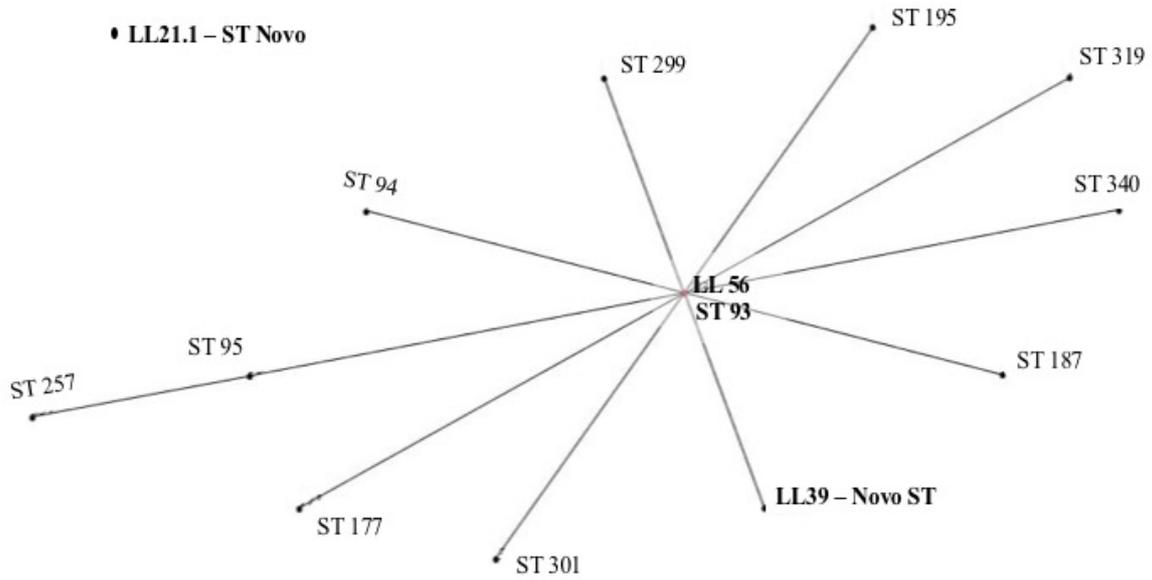


Figura 3: Diagrama gerado pelo eBurst v3 para os isolados de *C. neoformans*.

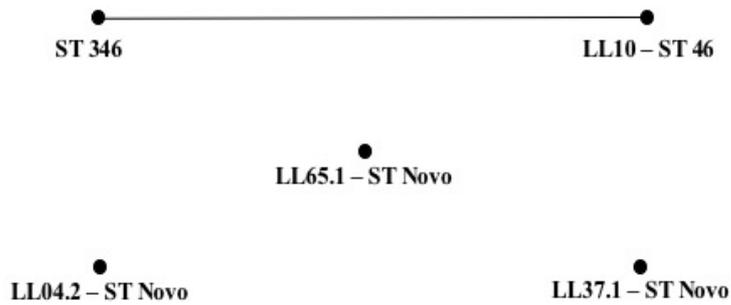


Figura 4: Diagrama gerado pelo eBurst v3 para os isolados de *C. gattii*.

Tabela 5: Resultados detalhados da avaliação da susceptibilidade a antifúngicos de isolados de poeira domiciliar de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Amostra	Espécie	AP		FL		KE		IT		POS	
		100%	80%	100%	80%	100%	80%	100%	80%	100%	
LL04.2	<i>C. gattii</i>	0,38	6	24	-	0,094	-	0,25	-	0,094	
LL10	<i>C. gattii</i>	0,38	24	>256	0,75	1,5	0,75	3	0,38	0,75	
LL37.1	<i>C. gattii</i>	0,38	4	8	-	0,125	0,094	0,38	-	0,125	
LL65.1	<i>C. gattii</i>	0,38	64	>256	0,38	1	0,75	2	0,25	0,5	
LL21.1	<i>C. neoformans</i>	0,25	6	48	0,125	0,25	0,25	0,75	0,064	0,19	
LL21.X	<i>C. neoformans</i>	0,125	3	6	-	0,064	0,047	0,19	-	0,064	
LL39	<i>C. neoformans</i>	0,19	6	12	0,125	0,25	0,064	0,38	0,094	0,19	
LL43	<i>C. neoformans</i>	0,25	8	24	0,094	0,19	-	0,38	0,094	0,19	
LL44	<i>C. neoformans</i>	0,19	4	16	0,008	0,023	-	0,19	-	0,094	
LL56	<i>C. neoformans</i>	0,19	8	16	0,125	0,19	0,064	0,25	-	0,125	
LL65.5	<i>C. neoformans</i>	0,19	6	16	0,064	0,125	-	0,25	-	0,094	
LL67	<i>C. neoformans</i>	0,25	12	24	0,094	0,125	-	0,25	0,094	0,125	
LL69	<i>C. neoformans</i>	0,19	-	2	0,047	0,094	-	0,25	0,047	0,094	
LL106	<i>C. neoformans</i>	0,19	2	6	-	0,064	-	0,25	-	0,064	

Legenda: AP: Anfotericina B; FL: Fluconazol; KE: Cetoconazol; IT: Itraconazol; POS: Posaconazol.

Tabela 6: Concentração inibitória mínima de cinco agentes antifúngicos testados contra 10 isolados ambientais de *C. neoformans*

Antifúngico	Faixa de CIM	Média Geométrica (µg/mL)	Varição (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
AP	0,002-32µg/mL	0,198	0,125 – 0,25	0,25
FL	0,016-256µg/mL	12,562	2 – 48	24
IT	0,002-32µg/mL	0,287	0,19 – 0,75	0,38
KE	0,002-32µg/mL	0,112	0,023 – 0,25	0,25
POS	0,002-32µg/mL	0,114	0,064 - 0,19	0,19

Legenda: AP, Anfotericina B; FL, Fluconazol; IT, Itraconazol; Ke, Cetoconazol; Pos, Posaconazol; CIM90, CIM em que 90% dos isolados foram inibidos.

Tabela 7: Concentração inibitória mínima de cinco agentes antifúngicos testados contra 4 isolados ambientais de *C. gattii*

Antifúngico	Faixa de CIM	Média Geométrica (µg/mL)	Variação (µg/mL)	CIM₉₀ (µg/mL)
AP	0,002-32µg/mL	0,38	0,38	0,38
FL	0,016-256µg/mL	59,599	8 – 256	256
IT	0,002-32µg/mL	0,869	0,25-3	3
KE	0,002-32µg/mL	0,364	0,094-1,5	1,5
POS	0,002-32µg/mL	0,258	0,094 - 0,75	0,75

Legenda: AP, Anfotericina B; FL, Fluconazol; IT, Itraconazol; Ke, Cetoconazol; Pos, Posaconazol; CIM90, CIM em que 90% dos isolados foram inibidos.

A avaliação da presença do antígeno foi realizada nos moradores das residências onde foi possível realizar o isolamento de *Cryptococcus* da poeira domiciliar. Das 12 casas positivas, em duas não foi possível realizar o exame. Na primeira, o morador não aceitou fazer o exame e na segunda não havia um responsável no local.

O teste foi aplicado em 20 moradores de 10 casas diferentes, em pessoas do sexo masculino e feminino, com idade entre 18 e 83 anos. A população foi predominantemente do sexo feminino (14/70%) e a faixa etária mais frequente foi entre 30 e 55 anos (11/ 55%), seguida de maiores de 56 anos (5/25%) e jovens entre 18 e 29 anos (4/20%). Todos os moradores avaliados, tiveram resultado negativo na avaliação do CrAg.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo, isolou *C. neoformans* (VNI) e *C. gattii* (VGII) de poeira domiciliar em moradias da Comunidade Rural do Lago do Limão em Iranduba/AM. Chama a atenção o fato de em duas residências haver a ocorrência mista de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Todas as residências onde houve isolamento de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* estavam localizadas na região mais central da comunidade, onde há uma maior concentração de pessoas e maior ação antrópica, é ainda a região mais próxima ao lago. A maioria das residências onde houve isolamento de *C. neoformans* e/ou *C. gattii* está em uma área que não sofre influência do ciclo da cheia e vazante. Mesmo nas casas onde a estrutura é mista (feita com madeira e tijolos), o assoalho das casas é feito sobre tijolos. E em apenas 1 residência, houve relato de ave (papagaio) sendo criada.

Estudos citando o isolamento de *Cryptococcus neoformans* e/ou *C. gattii* de poeira domiciliar são escassos. O primeiro trabalho de que se tem relato na literatura foi realizado na África, onde amostras de poeira foram coletadas em 79 casas, das quais 74 eram ocupadas por pessoas aparentemente saudáveis e em 5 domicílios habitavam pacientes com Aids associada a criptococose. *C. neoformans* foi encontrado em três casas, das quais em duas, os moradores eram pacientes com Aids associada a criptococose (SWINNE, 1986).

No ano de 1998, Baró *et al* relataram que não foi possível isolar *C. neoformans* e/ou *C. gattii* de poeira domiciliar na cidade de Barcelona, Espanha. Foram avaliadas 79 amostras de poeira (62 obtidos de moradores saudáveis, 11 de moradores HIV-positivas e, 6 de moradores com Aids e criptococose no momento da coleta). Os autores sugerem que possivelmente, as condições climáticas não favoreceram o desenvolvimento dos fungos, ao contrário do que acontece nas regiões tropicais.

No Brasil, existem poucos trabalhos publicados avaliando a presença de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em poeira, sendo dois em poeira domiciliar (PASSONI *et al*, 1998; COSTA, 2008; BRITO-SANTOS *et al*, 2015).

No Rio de Janeiro, Passoni *et al* (1998) realizaram no período de 1991 a 1993, avaliação de 699 amostras de poeira coletadas no interior de 154 habitações. Foi possível isolar *C. neoformans* de 24 amostras (3,4%) e em 25% do total de casas, havia algum tipo de ave. Estas descobertas sugerem a possibilidade de infecção adquirida no ambiente doméstico.

Em Belém, Costa (2008) realizou entre março de 2004 e abril de 2005 visitas aos domicílios de 8 pacientes com diagnóstico comprovado de criptococose. Foram coletadas 186 amostras de diversos ambientes destas, 10 amostras de poeira foram positivas para *C. neoformans* e/ou *C. gattii* (em poeira de cinco residências foram encontradas as duas espécies simultaneamente) dos tipos moleculares VNI e VGII.

O trabalho de Brito-Santos *et al* (2015) foi realizado na região amazônica, em Santa Isabel do Rio Negro, um município do estado do Amazonas. Foram avaliadas poeiras de 51 casas selecionadas aleatoriamente, destas 3 foram positivas para *C. gattii*. Diferente do encontrado no Rio de Janeiro, não haviam aves domésticas nas residências. E o isolamento de *C. gattii* pode estar relacionado à natureza das casas, que em sua maioria são construídas com tábuas de madeira obtidas de espécies nativas da floresta.

O trabalho de Meyer *et al* (2003) caracterizou 63 isolados brasileiros, descrevendo a prevalência do tipo molecular VNI (82,3%), VGII (13,6%) e VNII (3,0%). Corroborando os dados anteriormente citados, Trilles *et al* (2008) mapeou os tipos moleculares de *Cryptococcus* circulantes no Brasil, sendo a grande maioria do genótipo VNI (63,65%), seguido por VGII (20,76%) e VNII (4,96%).

No Amazonas, não há muitos trabalhos descrevendo os genótipos circulantes. Silva *et al* (2012) avaliou 40 isolados clínicos no período de 2006 a 2008, 31 (75,5%) foram

caracterizados como VNI e nove (22,5%) como VGII. Posteriormente, Freire *et al* (2012) realizou um estudo semelhante, em que foram avaliados 57 isolados clínicos no período de 2006 a 2010. Destes 68,42% (39 isolados) correspondiam ao genótipo VNI, 29,83% (17 isolados) ao VGII e 1,75% (1 isolado) ao VNII.

Estudo realizado por Alves *et al* (2016) identificou os tipos moleculares VNI e VGII em amostras ambientais de excretas de pombos, excretas de aves de cativeiro e oco de árvore coletados na cidade de Manaus. Brito-Santos *et al* (2015) identificou apenas VGII em poeira domiciliar no município de Santa Isabel do Rio Negro/AM. Indicando assim que os tipos moleculares obtidos neste trabalho são os mesmos encontrados em pacientes e em outros estudos realizados com amostras ambientais do estado do Amazonas.

A análise por MLST, permitiu a identificação de novos alelos de *C. gattii*, para os genes *CAP59* (2 alelos novos), *IGS1* (2 alelos novos) e *SOD1* (1 novo alelo) e, conseqüentemente 3 novos ST's (em alguns isolados, foram encontrados dois novos alelos). No esquema para *C. neoformans*, foram identificados no total dois novos alelos um para *GPD1* e outro para *PLB1*. Dois isolados de *C. neoformans* apresentaram o mesmo novo alelo para o gene *GPD1*.

Os isolados de *C. gattii* não pertencem a nenhum complexo clonal. Um isolado (LL10) pertence ao ST 46. Este ST foi descrito pela primeira vez por Lizarazo *et al* (2014) na Colômbia, do líquido de um paciente do sexo masculino de 26 anos.

O isolado LL56 de *C. neoformans* pertence ao ST 93 e é o responsável pela origem de um complexo clonal com isolados frequentemente encontrados na China, Indonésia, Kwait e Tailândia (KHAYHAN *et al*, 2013). O isolado LL39, faz parte deste complexo, enquanto o isolado LL21.1 forma um *singleton*.

Os ST's encontrados por Brito-Santos *et al* (2015), no interior do estado do Amazonas, diferem dos ST's encontrados neste estudo, revelando uma diversidade genética ainda e pouco estudada.

A avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos, revelou diferentes resultados para os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. Os isolados de *C. neoformans* apresentaram elevada variabilidade de susceptibilidade para fluconazol, com CIMs variando de 2 a 48 μ g/mL. Para *C. gattii*, a variabilidade foi observada para fluconazol (CIM variando entre 8-256 μ g/mL), itraconazol (CIM variando entre 0,25-3 μ g/mL) e cetoconazol (CIM variando entre 0,094-1,5 μ g/mL).

Levando em conta os ECVs propostos por Espinel-Ingroff et al (2012a, 2012b) apenas dois isolados de *C. neoformans* e dois de *C. gattii* apresentaram CIMs dentro dos limites propostos para Fluconazol e dois isolados de *C. gattii* foram resistentes (CIM > 256 μ g/mL). Para itraconazol, foram encontrados três isolados de *C. neoformans* e dois de *C. gattii* com resultado acima do proposto e para posaconazol apenas 1 isolado (de *C. gattii*) apresentou resultados superiores aos propostos por Espinel-Ingroff et al (2012a, 2012b).

Chama atenção o fato de dois isolados de *C. gattii* (LL10 e LL65.1) terem as maiores CIMs para fluconazol (>256 μ g/mL) e itraconazol (3 μ g/mL e 2 μ g/mL respectivamente).

Este estudo demonstra uma possível correlação de resistência a antifúngicos do ST 46 e de um ST novo (correspondente ao isolado LL65.1). Este é o primeiro estudo a fazer uma correlação do tipo.

Não há informações sobre os isolados de poeira quanto à susceptibilidade a antifúngicos. Todos os isolados ambientais descritos no Amazonas, que foram submetidos a avaliação da susceptibilidade a antifúngicos foram sensíveis (ALVES et al, 2016).

A avaliação da presença do antígeno em moradores que tiveram poeira domiciliar positiva para o isolamento de *C. neoformans* e/ou *C. gattii*, teve resultado negativo em todos os moradores testados. O teste foi aplicado em pessoas aparentemente saudáveis (sem sintomas de criptococose) de diferentes sexos e faixas etárias.

Grupos de risco para infecção por *Cryptococcus* são em geral aqueles com idade maior que 50 anos, fumantes, portadores do HIV ou têm uma história de câncer invasivo (MACDOUGALI, 2011).

A presença de CrAg é dependente da progressão da doença, podendo ser encontrada em soro, mas não LCR de alguns pacientes, indicando criptococose não-meníngea (PELFREY; BAUMAN, 2012). Williams *et al* (2015) demonstraram concordância de 100% entre sangue total, soro e plasma e demonstrou ainda que CrAg LFA por punção digital é um teste de diagnóstico confiável podendo ser uma ferramenta importante e simples para o diagnóstico de meningite criptocócica.

CONCLUSÕES

Confirmou-se a presença de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* em poeira domiciliar de uma comunidade rural de Iranduba/AM apresentando ampla distribuição por toda a comunidade e os tipos moleculares identificados (VNI e VGII) correspondem aos tipos responsáveis pela maioria dos casos de infecção humana encontrados no Amazonas (VNI, VGII e VNII).

A análise do multilocus identificou sete novos alelos, resultando em cinco novos ST's. Dois ST's já conhecidos foram relatados pela primeira vez no Amazonas.

O teste de susceptibilidade a antifúngicos mostrou que a maioria dos isolados são sensíveis para anfotericina B, itraconazol, cetoconazol e posaconazol, mas houve resistência para fluconazol por dois isolados de *C. gattii*.

E, a avaliação da presença do antígeno criptocócico foi negativo em todos os moradores participantes, mesmo tendo sido encontrado *Cryptococcus* em suas moradias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGG MA, *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v.161, p.83-91, 2006.

AJELLO, L. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. **Am J Hyg**, v.67, n.1, p.72-77, 1958.

ALVES GSB, *et al.* Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v.59, n.8, p.509-515, 2016.

ANZAI MC, *et al.* *Cryptococcus gattii* in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses** v.57, p.414-418, 2014.

BARNETT, JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v.27, n.11, p.875-904, 2010.

BARONI FA, *et al.* *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v.48, n.2, p.71-75, 2006.

BOEKHOUT T, *et al.* Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891-907, 2001.

BRITO-SANTOS F, *et al.* Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PLoS One**, v.10, n.2, e0115866, 2015.

CASTRO E SILVA DM, *et al.* First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Med Mycol**, v.54, n.1, p.97-102, 2016.

CATTANA ME, *et al.* Native trees of the Northeast Argentina: Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. **Rev Iberoam Micol** v.31, p.188-192, 2014.

CHEN SCA *et al.* Identification by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of a common molecular type of *C. neoformans* var *neoformans* in patients with AIDS. **J Infect Dis**, v.173, p.754-758, 1996.

_____. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. **Clin Infect Dis**, v.55, n.6, p.789-798, 2012.

_____. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Ver**, v.27, n.4, p.980-1020, 2014.

CHONG, HS, *et al.* In Vitro Susceptibility of the Yeast Pathogen *Cryptococcus* to Fluconazole and Other Azoles Varies with Molecular Genotype. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 11, p. 4115-4120, 2010.

CHOWDHARY A, *et al.* Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. **Clin Microbiol Rev** v.38, p.1-16, 2012.

CICHON M, *et al.* Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. **RBAC**, v. 43, n. 3, p. 176-179. 2011

COELHO C; BOCCA A; CASADEVALL A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 87, p. 1-41, 2014.

COLOM MF, *et al.* *Ceratonia siliqua* (carob) trees as natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean environment. **Med Mycol** v.50, p.67-73, 2012.

COLOMBO FA, *et al.* Updating: Cryptococcosis diagnostic aspects. **J AIDS Clin Res**, v.5, n.12, 2014.

CÓRDOBA S, *et al.* Susceptibility profile and epidemiological cut-off values of *Cryptococcus neoformans* species complex from Argentina. **Mycoses**, 2016. doi: 10.1111/myc.12479.

COSTA, SPSE. Isolamento e caracterização molecular de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de fontes ambientais na região metropolitana de Belém, Pará. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

COSTA SPSE, *et al.* First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104, n.4, p.662-664, 2009.

De JESUS MS, *et al.* *Cryptococcus neoformans* carried by *Odontomachus bauri* ants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.4, p.466-469, 2012.

ELLIS DH; PFEIFFER TJ. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v.28, p. 1642-1644, 1990a.

_____. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v.336, n.8720, p.923-925, 1990b.

EMMONS, CW. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **J Bacteriol**, v.62, n.6, p.685-690, 1951.

_____. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **Am J Hyg**, v.62, n.3, p.227-232, 1955.

_____. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. **Public Health Rep**, v. 75, n. 5, p. 362-4, 1960.

ESPINEL-INGROFF A, *et al.* *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.3107-13, 2012a.

_____. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazol. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, p.5898-5906, 2012b.

FERREIRA AS, *et al.* Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. **Mycoses** v.57, p.98-104, 2014.

ERGIN Ç; ILKIT M; KAFTANOĞLU O. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. **Mycoses**, v.47, n.9, p.431-434, 2004.

FRASES S, *et al.* Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. **Rev Iberoam Micol** v.26, p.112-117, 2009.

FREIRE AK, *et al.* Molecular characterisation of the causative agents of Cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas-Brazil. **Mycoses**, v.55, n.3, e145-50, 2012.

FRENCH N, *et al.* Cryptococcal infection in a cohort of HIV-1-infected Ugandan adults. **AIDS**, v.16, n.7, pp.1031–1038, 2002.

GRANADOS DP, CASTAÑEDA E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology**, v.49, p. 282-290, 2005.

HAGEN F, *et al.* Molecular characterization of *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII isolated from woody debris of divi-divi (*Caesalpinia coriaria*), Bonaire, Dutch Caribbean. **Rev Iberoam Micol**, v.31, n.3, p.193-196, 2014.

_____. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, v.78, p.16-48, 2015.

HORTA JA, *et al.* Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp in Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz J Microbio**, v.36, n.1, p. 1-6, 2005.

ILLNAIT-ZARAGOZI MT, *et al.* Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city, Cuba. **Mycoses** v.55, n.3, e:138-144, 2012.

_____. *Cryptococcus* and Cryptococcosis in Cuba. A minireview. **Mycoses**, v.57, n.12, p. 707-717, 2014.

KAO CJ, SCHWARZ J. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests, with remarks on the identification of virulent cryptococci. **AJCP**, v.27, p.652-563, 1957.

KHAYHAN K, *et al.* Geographically structured populations of *Cryptococcus neoformans* Variety *grubii* in Asia correlate with HIV status and show a clonal population structure. **PLoS One**, v.3, n.8, e72222, 2013.

KHAN ZU, *et al.* Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygium cumini* trees in north-western India. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 2, p. 312–316, 2007.

KWON-CHUNG, KJ. A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia** v.67, p. 1197–1200, 1975.

LACAZ C S, *et al.* **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9a ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LAZÉRA MS, *et al.* Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J Med Vet Mycology**, v. 31, p.494-454, 1993.

_____. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **J Med Vet Mycol** v.34, p.127-131, 1996.

_____. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. **Med Mycol**, v.36, p. 119-122, 1998

_____. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med Mycol**; v. 38, p. 379-383, 2000.

_____. Criptococose. In: SIDRIM JJC, ROCHA FGM. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LEONE, R. *Criptococco neoformans* e cute. I. Ecologia del *Criptococco neoformans*. **Giorn Ital Derm Minerva Derm**, v.44, p.380-386, 1969.

LIZARAZO J, *et al.* Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997-2011. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.11, e3272, 2014.

MACHADO CC, AMARAL AA, SEVERO LC. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.35, p.77-79, 1993.

MATOS CS, *et al.* Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. In Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1647-1652, 2012.

MAY RC, *et al.* *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol** v.14, n.2, p.106-117, 2016.

MAZIARZ KE, PERFECT JR. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin N Am** v.30, p.179-206, 2016.

MAZZA M, *et al.* *Cryptococcus gattii* in urban threes from cities in North-eastern Argentina. **Mycoses** v.56, p.646-650, 2013.

MELLO NT, *et al.* Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excretas de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Rev Bras Med**, v.44, p.19-23, 1987.

MEYER W, *et al.* Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis** v.9, p.189-195, 2003.

_____. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol** v.47, n.6, p.561-570, 2009.

MIN K H; KWON-CHUN, K J The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralbl Bakteriol Hyg A**, v.261, p. 471-480, 1986.

MITCHELL T; PERFECT JR. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microb Rev**, v.8, n.4, p. 515-548, 1995.

MORAES EMP; PRÍMOLA NS; HAMDAN JS. Antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal drugs determined by two techniques. **Mycoses**, v.46, n. 5-6, p.164-168, 2003.

MONTAGNA MT, *et al.* Cavernicolous habitats harbouring *Cryptococcus neoformans*: results of a speleological survey in Apulia, Italy, 1999-2000. **Med Mycol**, v.41, p.451-455, 2003.

PAPPALARDO MC; MELHEM MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299-305, 2003.

PARK BJ, *et al.* Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, p.525-530, 2009

PASSONI LF, *et al.* *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **J Med Vet Mycol**, v.36, p.305-311, 1998.

PEDROSO RS; FERREIRA JC; CANDIDO RC. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 239-243, 2006.

PELFREY J; BAUMAN S. CrAg LFA: the new gold standard for diagnosis and prevention of cryptococcal disease. Disponível em: www.immy.com/wp-content/uploads/2011/12/CrAgLFA_InternationalWhitePaper_final.pdf

PERFECT JR. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.45, n.3, p.395-404, 2005.

_____. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, p. 463-468, 2006.

PETROU MA; SHANSON, DC. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* by the NCCLS microdilution and Etest methods using five defined media. **J Antimicrob Chemother**, v.46, n.5, p.815-818, 2000.

PFALLER M; WENZEL R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.11, n.4, p.287-291, 1992.

PFALLER MA, *et al.* Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J Clin Microbiol**, v.43, n.5, p.2163-2167, 2005.

PFEIFFER TJ, ELLIS DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. **J Infect Dis**, v.163, p.929–930, 1991.

_____. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. **J Med Vet Mycol**, v.30, p.407–408, 1992.

POLLONELLI, L. **History of Medical Mycology – File 1**. ISHAM. Disponível em: <http://www.isham.org/History/index.html>

ROGERS, AL, BENEKE, ES. Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. **Mycopathologia** v.22, p.10-20, 1964.

SIDRIM JJC; MOREIRA JLB. Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

SIDRIM JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.388p.

SILVA, ME. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* e *Microsporium gypseum* em solos da Bahia. **Bol Fund G Moniz**, v.17, p.1-14, 1960.

SILVA, ME; PAULA, LA. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia (Brasil). **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v.5, p.9-11, 1963.

SILVA BK, *et al.* Characterization of clinical isolates of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v.29, n.1, p.40-43, 2012.

SOUZA LKK, *et al.* Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 253-256, 2005.

SOUZA, PWG. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin (1901) de *Periplaneta americana* (Linneu, 1758) recolhidas de ambientes públicos. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SPRINGER, DJ, CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.1, p.14-20, 2010.

STAIB, F. Vogelkot, ein Nährsubstrat für die Gattung *Cryptococcus*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Erste Abteilung*, 186, p.233-247, 1962.

SUN H, *et al.* Unrecognized pretransplant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. **Clin Infect Dis**, v.51, n.9, p.1062–1069, 2010.

SWINNE, D, KAYEMBE, K, NIYIMI, M. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in Kinshasa, Zaire. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.** v.66, p. 57-61, 1986.

SWINNE D, *et al.* Isolation of *Cryptococcus neoformans* from houses of AIDS-associated cryptococcosis patients in Bujumbura (Burundi). **AIDS**, v.3, n.6, p.389-390, 1989.

ROMEO O, *et al.* *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* species complex in Italy: An overview on the environmental diffusion of serotypes, genotypes and mating-types. **Mycopathologia**, v.174, p.283-291, 2012.

TANNER DC, *et al.* Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. **J Clin Microbiol**, v.32, n.7, p.1680-1684, 1994.

TAY ST, *et al.* In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 324-330, 2006.

THOMPSON III GR, *et al.* Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n.1, p. 309-311, 2009.

TRILLES L, *et al.* In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **J Clin Microbiol**, v.42, n.10, p.4815-4817, 2004.

_____. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.455-462, 2008.

TRPKOVIC A, *et al.* In vitro antifungal activities of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole and itraconazole against *Cryptococcus neoformans* isolated from cerebrospinal fluid and blood from patients in Serbia. **J Mycol Med**, v. 22, n. 3, p 243-248, 2012.

TSURUBA, E. Experimental studies in cryptococcosis. 1. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from avian excreta and some consideration on the source of the infection. **Japan J Med Mycol**, v. 3, p.50-55, 1962.

VANBREUSEGHEM R, TAKASHIO M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin, 1895, II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Ann. Soc Belg Med Trop** v.50, p.692-702, 1970.

VANSELOW M, BRANDT ME, PARK BJ. Diagnosis and management of cryptococcal disease in resource-limited settings. **Curr Fungal Infect Resp**, v.6, p.35-40, 2012.

VARMA A, KWON-CHUNG KJ. DNA probe for strain typing of *Cryptococcus neoformans*. **J Clin Microbiol** v.30, p.2960-29667, 1992.

_____. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.

WILLIAMS DA, *et al.* Evaluation of fingerstick cryptococcal antigen lateral flow assay in HIV-infected persons: a diagnostic accuracy study. **Clin Infect Dis**, v.61, n.3, p.464-467, 2015.

ZARAGOZA O, *et al.* Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathog**, v.6, e1000945, 2016.

ANEXOS

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B - *Primers* e condições para amplificação utilizados para a realização do MLST

Anexo C – Detalhamento dos isolados obtidos

Anexo D - Detalhamento do MLST das amostras inconclusivas

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS SOCIOAMBIENTAIS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS NA COMUNIDADE RURAL DO LIMÃO, MUNICÍPIO DE IRANDUBA/ AM - PARTE II

Pesquisador: ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41067414.6.0000.5020

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.016.748

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se da resposta ao Parecer No. 946.044 03/02/2015. O projeto é um estudo epidemiológico, transversal, integrado de avaliação de aspectos sócio ambientais, epidemiológicos e biológicos. O objetivo principal é diagnosticar as condições sanitárias, sociais e ambientais, o perfil socioeconômico e a susceptibilidade dos moradores na comunidade rural do Limão, município de Iranduba/AM, associando-as com a presença de patógenos causadores de doenças, com vistas a contribuir para implantação de medidas de prevenção e controle destes agravos. O projeto pertence à Grande Áreas do Conhecimento (CNPq) Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde e Grande Área 6. Ciências Sociais Aplicadas. A pesquisadora responsável é pesquisadora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura do CPqLMD/Fiocruz-Amazônia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar aspectos socioambientais da comunidade rural do Limão no município de Iranduba – AM, priorizando as condições sanitárias e a identificação de patógenos dentre a população e no ambiente.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

Anexo B – Primers e condições para amplificação utilizados para a realização do MLST

Gene	Nome do gene	Localização no cromossomo	Nome do primer e sequência	Condições de amplificação	No. De bases analisadas (bp)
<i>CAP59</i>	Capsular associated protein	1	CAP59F 5' CTCTACGTCGAGCAAGTCAAG 3' CAP59R 5' TCCGCTGCACAAGTGATACCC 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min	559
<i>GPD1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7	GPD1F 5' CCACCGAACCCTTCTAGGATA 3' GPD1R 5' CTTCTTGGCACCTCCCTTGAG 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 45s, 63°C 1min, 72°C 2min	543
<i>LAC1</i>	Lacase	8	LAC1F 5' AACATGTTCCCTGGGCCTGTG 3' LAC1R 5' ATGAGAATTGAATCGCCTTGT 3'	94°C 3min; 30 ciclos: 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 1min	469
<i>PLB1</i>	Phospholipase	12	PLB1F 5' CTTCAGGCGGAGAGAGGTTT 3' PLB1R 5' GATTTGGCGTTGGTTTCAGT 3'	94°C 3min; 30 ciclos: 94°C 45s, 61°C 45s, 72°C 1min	532
<i>SOD1</i>	Cu, Zn superoxide dismutase	5	Primers para <i>C. neoformans</i> SOD1CNF 5' AAGCCTCTCATCCATATCTT 3' SOD1CNR 5' TTCAACCACGAATATGTA 3' Primers para <i>C. gattii</i> SOD1CGF 5' GATCCTCACGCCATTACG 3' SOD1CGR 5' GAATGATGCGCTTAGTTGGA 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 1.5min	700
<i>URA5</i>	Orotidine monophosphate pyrophosphorylase	8	URA5F 5' ATGTCCTCCCAAGCCCTCGAC 3' URA5R 5' TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 45s, 63°C 1min, 72°C 2min 72°C 1min	601
<i>IGS1</i>	Ribosomal RNA intergenic spacer	2	IGSF 5' ATCCTTTGCAGACGACTTGA 3' IGSR 5' GTGATCAGTGCATTGCATGA 3'	94°C 3min; 35 ciclos: 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min	723

Anexo C – Detalhamento dos isolados obtidos

ID	Isolado	Espécie	Tipo Molecular	ST
04	04.1	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	04.2	<i>C. gattii</i>	VGII	Novo
10	10.1	<i>C. gattii</i>	VGII	46
	10.2	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
21	21.1	<i>C. neoformans</i>	VNI	Novo
	21.2	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.3	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.4	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.5	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.6	<i>C. gattii</i>	VGII	Inconclusivo
	21.7	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.8	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.9	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.10	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.11	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.12	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.13	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.14	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.15	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.16	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.17	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.18	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.19	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.20	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	21.x	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
37	37.1	<i>C. gattii</i>	VGII	Novo
	37.2	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	37.3	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	37.4	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
39	39	<i>C. neoformans</i>	VNI	Novo
43	43.1	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
	43.2	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	43.3	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado

ID	Isolado	Espécie	Tipo Molecular	ST
44	44	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
56	56	<i>C. neoformans</i>	VNI	93
65	65.1	<i>C. gattii</i>	VGII	Novo
	65.2	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	65.3	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	65.4	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	65.5	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
	65.6	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
	65.7	<i>C. neoformans</i>	VNI	Não Testado
	65.8	<i>C. gattii</i>	VGII	Não Testado
67	67	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
69	69	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo
106	106	<i>C. neoformans</i>	VNI	Inconclusivo

Anexo D – Detalhamento do MLST das amostras inconclusivas

Amostra	Espécie	<i>CAP59</i>	<i>GPD1</i>	<i>IGS1</i>	<i>LAC1</i>	<i>PLB1</i>	<i>SOD1</i>	<i>URA5</i>
LL21.6	<i>C. gattii</i>	26	Inconclusivo	4	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	7
LL21.X	<i>C. neoformans</i>	1	Inconclusivo	25	3	4	1	1
LL43	<i>C. neoformans</i>	Inconclusivo	Inconclusivo	10	3	4	1	1
LL44	<i>C. neoformans</i>	1	23	10	3	4	Inconclusivo	1
LL65.5	<i>C. neoformans</i>	1	Inconclusivo	10	3	4	Inconclusivo	1
LL67	<i>C. neoformans</i>	Inconclusivo	Inconclusivo	25	3	4	1	1
LL69	<i>C. neoformans</i>	Inconclusivo	3	10	5	2	Inconclusivo	1
LL106	<i>C. neoformans</i>	1	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	1